

BL44XU 生体超分子複合体構造解析

1. はじめに

生体超分子構造解析ビームライン (BL44XU) は、生体内の組織化された機能を理解するために、多様な機構で反応系を制御している生体超分子複合体の立体構造をX線結晶構造解析法により解明することを目的として、大阪大学蛋白質研究所が中心となって建設を進めてきた。本ビームラインは、学術振興会未来開拓事業、科学技術振興事業団 (現 科学技術振興機構) 及び文部省 (現 文部科学省) 補正予算より援助を受けて、1996年度より建設を始め、1999年秋から正式に利用を開始した。その後も補正予算、総長裁量経費及び蛋白質研究所所内予算などの他、タンパク3000やJAXAとの共同研究、ターゲットタンパク研究プログラム、創薬等支援技術基盤プラットフォームなどの外部資金により、検出器や光学系、光学ベンチなどの高度化を進めてきた。

2. ビームラインの概要

SPRING-8標準型の真空封止式アンジュレータを光源とし、光学ハッチ内に設置した液体窒素冷却式二結晶モノクロメータで単色化して実験ハッチに導入している。実験ハッチ内には水平集光型のロジウムコートミラーが設置しており、高調波の除去と水平方向の集光を行うことができる (図1)。

回折強度データ測定部は、 μ 軸回転機構付高精度ゴニオメータ、可動式ダイレクトビームストッパー及び照明装置を組み込んだファンシーボックス、2次元検出器及び試料冷却装置から構成されている (図2)。

通常は0.9 Åの単色X線を用いて実験を行っているが、この時のサンプル位置でのミラー集光後のビームサイズ (FWHM) は0.5 mm (W) × 0.06 mm (H) である。この波長におけるスリットの開口幅を0.05 × 0.05 mm²とし

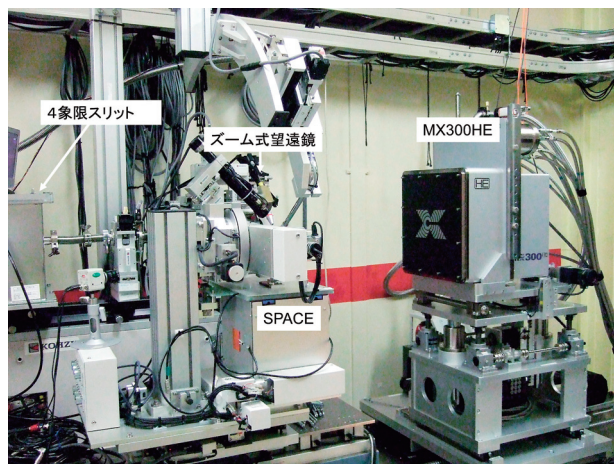


図2 回折強度データ測定部

た時のビーム強度は 3.8×10^{11} photons/sec である。

また、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業のサポートを得て、二結晶分光器の低振動対策を行った。

2-1 ゴニオメータ部

ゴニオメータ部は、高速シャッター、ビーム整形部、高精度・高速ゴニオメータ、同軸望遠鏡等から構成されている (図3)。これらは、すべて光軸調整機構を有している他、高速シャッター以外のコンポーネントはすべて3軸制御可能な共通のステージの上に乗っており、ハッチ外のPCから簡単に光軸調整を行うことができる。

高速シャッターは、1 msecでの開閉の制御が可能である。これにより部分反射の測定精度を上げる他、微小振動写真法への対応が可能となっている。

ビーム整形部は、ビームの形状の制限とスリット自身による散乱の問題を解消するために、2式の4象限スリット

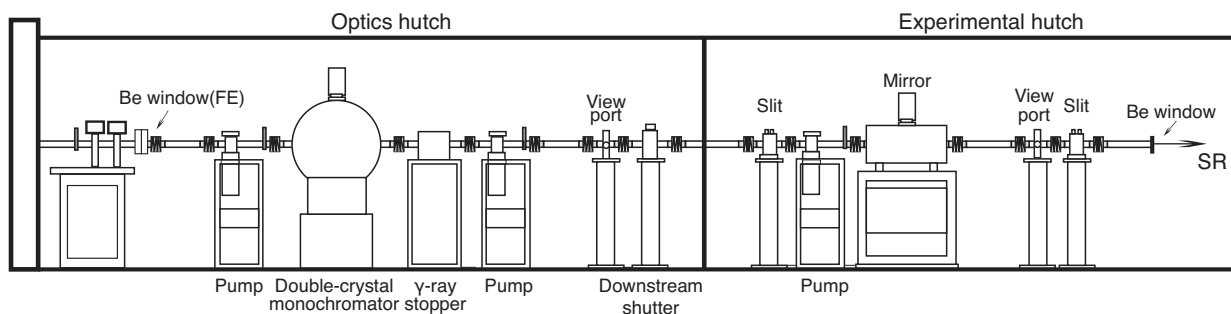


図1 ビームラインコンポーネント

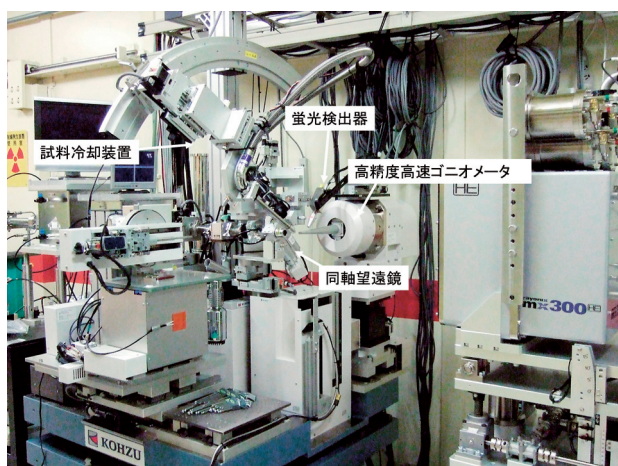


図3 ギonioメータ部

とビームパスを兼ねた0.3 mm ϕ の出口スリットから構成されている。4象限スリットは1 μm ステップでの制御が可能である。これにより、結晶の大きさ・形に合わせたビームの切り出しが可能である。上流にビーム整形用の4象限スリットを、そこから30 cm程度下流に出口スリットを設置することにより、スリットからの散乱の問題を解消し、150 $\text{\AA}$ 以下の低分解能領域のデータ収集を可能とした。

ゴニオメータ部はエアベアリングを利用した高精度・高速型ゴニオメータを利用している。本ゴニオメータは、最大偏心精度が $\pm 1 \mu\text{m}$ 以下で、最大180 deg/secで駆動することができ、inverse beam settingの実験が効率良く行える。さらに、このゴニオメータは、試料回転軸をX線の仮想光軸に対して水平面に 0° から 15° まで傾斜(ω 軸)させることが可能である。

ゴニオメータに取り付けた結晶は、同軸望遠鏡によりハッチ内及びハッチ外で観察可能である。また、結晶のセンタリング(及び望遠鏡のズーム比の変更)は制御用PCから行うことができる。

2-2 2次元検出器

有効面 $300 \times 300 \text{ mm}^2$ の高感度大面積アレイ式CCD検出器(Rayonix MX-300HE)が利用できる。本検出器の能力を生かすために、創業等支援技術基盤プラットフォーム事業の支援を受けて開発したカメラステージを利用することで、格子定数が2000 $\text{\AA}$ の巨大格子定数の結晶から3.7 $\text{\AA}$ 分解能以上のデータ収集が可能となった。また、同時に、光学系のレイアウト変更なしで、0.6 $\text{\AA}$ 以上の超高分解能のデータ収集も可能である。

2-3 試料冷却装置

タンパク質あるいは生体超分子複合体のデータ収集には、試料の冷却は不可欠である。通常は、液体窒素を利用した試料冷却装置を用い100 K付近の温度でデータ収集

を行うが、より低温での実験を行うために液体ヘリウムを用いて35 K程度に試料を冷却することも可能な試料冷却装置を利用することができる。窒素とヘリウムの切り替えは実験に応じて簡単に行うことができる。

2-4 多波長異常分散法への対応

本ビームラインでは、液体窒素間接冷却型二結晶分光器を使用しているため、多波長異常分散法の実験も可能である。通常の利用では、0.7～1.7 $\text{\AA}$ 領域の実験には、ユーザーによるビーム調整なしで、簡単に多波長異常分散法のための波長校正も含めた波長変更を行うことができる。

2-5 ユーザーインターフェイス

SPring-8の他のタンパク質結晶学用ビームラインで利用されているデータ収集システム(BSS)を導入している。これにより、SPring-8の他のタンパク質結晶学用ビームラインの利用経験があれば、わずかな教育のみで本ビームラインを利用することができる。

また、結晶マウントロボットSPACEを導入した。

3. 共同利用の現状

蛋白質研究所共同研究員として全国の研究者からの共同利用実験を受け入れる体制を整え、全ユーザタイムの約50%を共同利用に供しており、2013年度は、延べ680人以上が共同利用枠で利用した。海外からのユーザーに対しては、蛋白研国際共同研究員制度を利用した旅費のサポートも行っている。さらに、台湾国立放射光科学研究センター(NSRRC)との共同研究協定に基づいて、台湾の構造生物学研究グループに対してビームタイムを供している。

共同利用実験課題募集は年1回1月初旬に行われている他、重要な研究成果が期待され新たに結晶ができたものに関しては、緊急課題として随時実験課題を受け入れている(図4)。

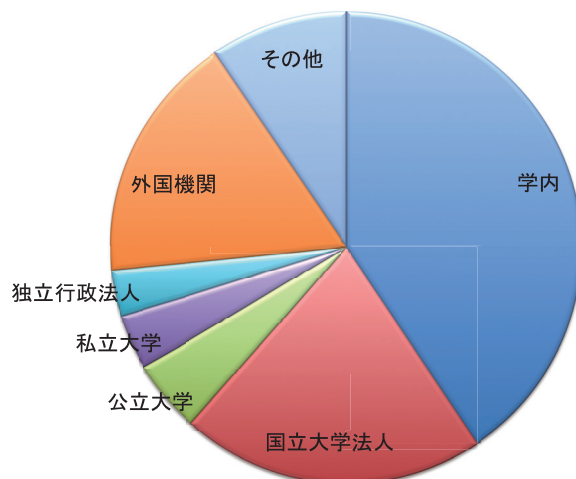


図4 ビームタイム配分実績

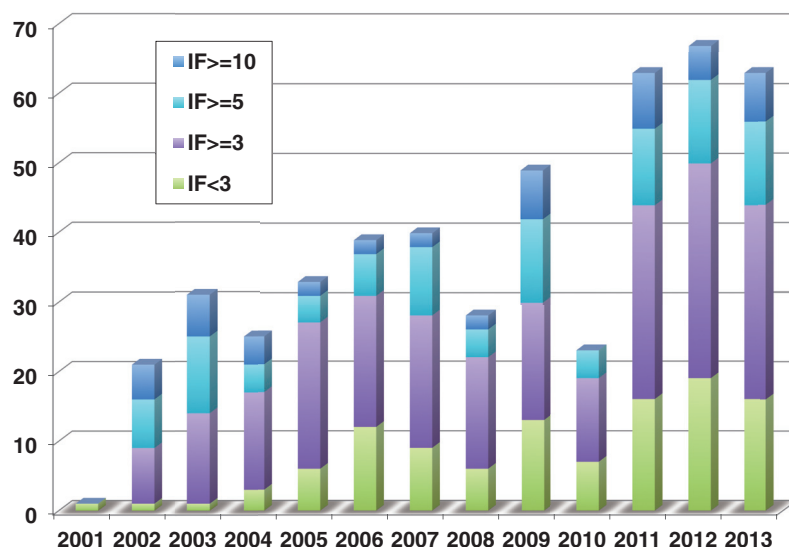


図5 ビームラインを利用した論文数 (IF: Impact Factor)

4. 創業等支援技術基盤プラットフォーム

創業等支援技術基盤プラットフォームの支援業務として、超分子蛋白質（格子定数の大きな結晶）のデータ収集に関する支援を行っており、ビームタイムの10%程度を支援枠として確保している。

5. 超分子複合体の代表的な成果

Vaultは、分子量1300万の巨大な蛋白質核酸複合体である。Vaultの結晶は、空間群C2に属し、格子定数が $a = 707.2$, $b = 383.8$, $c = 598.5$ Å, $\beta = 124.7^\circ$ の巨大な単位格子からできている。本ビームラインを利用して、3.5 Å分解能の回折強度データの収集に成功し、その原子構造を決定した (Tanaka *et al.*, Science, 2009)。

2013年度の主な成果として、Psy2-Csm3複合体 (Sasanuma *et al.*, Nat. Commun., 2013)、薬剤排出蛋白質調整因子RamR (Yamasaki *et al.*, Nat. Commun., 2013)、薬剤排出ポンプ (Nakashima *et al.*, Nature, 2013)、アフリカトリパノソーマ由来シアン耐性酸化酵素 (Shiba *et al.*, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 2013)、古細菌由来オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (Matsumoto *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012)、NADPH-シトクロムP450還元酵素とヘムオキシゲナーゼ複合体 (Sugishima *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, 2014)などが挙げられる (図5)。

6. 国際共同研究

NSRRCと研究協定を結び、ビームラインの相互利用や高度化に関する共同研究を進めている。

大阪大学

中川 敦史、山下 栄樹

東浦 彰史

(独)理化学研究所・放射光科学総合研究センター

(公財)高輝度光科学研究センター

山本 雅貴

(公財)高輝度光科学研究センター

熊坂 崇